

氏名(本籍)	石崎直人(茨城県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第15号
学位授与年月日	平成19年9月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	食肉由来 <i>Enterococcus</i> 属菌の疫学的研究
論文審査委員	(主査) 福山正文 (副査) 松田基夫 山本静雄

### 論文内容の要旨

腸球菌は *Enterococcus* 属菌の総称であり、ヒトおよび動物の腸管内に常在する通性嫌気性のグラム陽性球菌である。本菌は食品衛生分野においては、冷凍や加熱に対して大腸菌群のように容易に損傷、死滅しないため、従来から汚染指標菌として位置づけられている。一方、臨床分野ではβ-ラクタム系薬剤やサルファ剤などに自然耐性を示すが病原性は低いと考えられていた。しかし、1980年代後半からバンコマイシン(VCM)に対する耐性を獲得したVCM耐性腸球菌(VRE: vancomycin-resistant enterococci)の出現がヨーロッパで報告され、薬剤耐性菌として注目されるようになってきた。さらに、VRE以外の腸球菌も特に免疫力の低下した易感染者に危害を及ぼす可能性が憂慮されている。腸球菌の中でも *Enterococcus faecalis* や *Enterococcus faecium* は、ヒトの疾病との関わりが考えられる病原因子を保有する株のあることが報告され注目されている。そこで、本菌のヒトへの感染源に関する基礎的研究として、特に国産および輸入鶏肉におけるVREの汚染状況を調べて疫学的解析を行うと共に、国産および輸入食肉(鶏肉)における腸球菌の汚染状況と病原遺伝子検出状況について検討した。その概要は以下の通りである。

- 1) 東京都内で購入した国産鶏肉56件および輸入鶏肉32件(ブラジル産11件、中国産8件、米国産8件、タイ産5件)の計88件を対象にVREの汚染実態を調べた結果、19件(21.6%)から本菌が分離された。その内訳は、VanA型VREが3件、VanC型VREが16件であった。VanA型VREが分離された鶏肉はいずれも輸入鶏肉で、ブラジル産1件(9.1%)とタイ産2件(40.0%)であった。VanC型VREが分離された鶏肉は、輸入が5件[中国産1件(12.5%) およびブラジル産4件(36.4%)]、国産鶏肉が11件(19.6%)であった。
- 2) 分離されたVRE19株について菌種型別を行ったところ、VanA型のブラジル産由来の1株は *E. faecium*、タイ産由来の2株は *E. faecalis*、VanC型の16株は全て *E. gallinarum* であった。

3) VRE19株についてVCMとテイコプラニン (TEIC) の薬剤感受性試験を行い、MIC値を測定した結果、VanA型のVRE 3菌株はVCMに対して256mg/ml以上の高度耐性を示したが、TEICに対しては6mg/ml以下の感受性を示した。VanC型のVRE 16菌株は、VCMに対して4mg/ml以下の低度耐性を示し、TEICに対しては0.94mg/ml以下の感受性を示すことが明らかになった。

4) これらの菌株について、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法、random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法、PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を用いて分子疫学的解析を行った。ApaIおよびSmaIの制限酵素を用いたPFGE法による解析では、VanA型VREであるタイ産鶏肉由来の2株は類似したパターンを示したが、ブラジル産鶏肉由来株とは異なるジェノタイプの株であることが明らかになった。さらにVanC型VREでは、国産および輸入鶏肉由来株は全て異なったパターンを示した。この様に、ApaIおよびSmaIを用いたPFGE法は疫学解析に有効であることも明らかとなった。

5) 次に、プライマーAP40、AP41、OPA2、OPA3、OPA8、OPA9を用いたRAPD法による分子疫学的解析を行った。VanA型VREであるタイ産鶏肉由来2株は、AP40プライマーでは11本、AP41プライマーでは10本、OPA8プライマーでは4本、そしてOPA9プライマーでは6本のDNA断片が認められる全く同一のRAPDパターンを示した。一方、ブラジル産鶏肉由来の*E. faecium* 99T7-1株は、AP40プライマーでは5本、AP41プライマーでは6本、OPA8プライマーでは3本、OPA9プライマーでは4本のDNA断片が認められるRAPDパターンを示し、タイ産鶏肉由来の2株とは異なるジェノタイプであることが明らかとなった。VanC型VREのうちブラジル産鶏肉由来4株は、AP40プライマーで3パターン、OPA2プライマーで2パターンにそれぞれ識別され、中国産鶏肉由来株とは異なるパターンを示した。国産鶏肉由来11株は、AP40プライマーで5パターン、OPA3プライマーで10パターンにそれぞれ識別されることが明らかになった。PFGE法同様、RAPD法も疫学解析に有効な方法であることが示唆された。

6) *vanA* および *vanC* 領域を増幅して解析するPCR-RFLP法を用いて解析を行った結果、輸入鶏肉から分離されたVanA型VRE3株は制限酵素BamHI、HincIIおよびPstIで2本、MspIでは5本に切断され、同一のRFLPパターンを示した。VanC型VREは、HincIIでは2本または3本の2群に、MspIでは3本または4本のDNA断片が認められる2群に識別された。SalIでは、16株の全てが2本に切断され同一のパターンを示した。

7) 次に、東京都内で2005年から2006年に購入した国産食肉153件および輸入食肉36件の合計189件を対象に、腸球菌の汚染状況について調べた結果、*E. faecalis* は国産食肉から113件 (73.9%)、輸入食肉26件 (72.2%)、*E. faecium* は国産食肉13件 (8.5%)、輸入食肉3件 (8.3%) から分離され、国産食肉、輸入食肉いずれも*E. faecalis* に高率に汚染されていることが明らかとなった。

8) 食肉から分離された腸球菌についてgelatinase (*gelE*) 遺伝子、aggregation substance (*asaI*) 遺伝子、cytolysin (*cyl*) 遺伝子、enterococcal surface protein (*esp*) 遺伝子の状況をPCR産物の有無により検討した。国産食肉由来の*E. faecalis* および*E. faecium* では、それぞれ97件 (63.4%) と1件 (0.7%)

で、輸入食肉由来 *E. faecalis* では26件 (72.2%) で、4つの遺伝子のうちいずれか1つの遺伝子の増幅されていることが明らかとなった。

9) *E. faecalis* に認められたPCR産物の増幅により検出された病原遺伝子のうち、国産食肉由来192株では *gelE* のみが検出された株が68株、*gelE* および *asa1* の両遺伝子が検出された株が59株、*gelE*、*asa1* および *cylA* の3つの遺伝子が検出された株が17株であった。一方、輸入食肉由来50株では、*gelE* および *asa1* の両遺伝子が検出された株が19株、*gelE* のみが検出された株が12株であった。

10) *gelE* または *cylA* 遺伝子の検出された株を用いて、PCR産物の増幅による遺伝子の検出とその遺伝子の発現状況を検討した結果、*gelE* 検出株のうちゼラチナーゼ産生性を示したものは、国産食肉では148株中140株 (94.6%)、輸入食肉では39株中36株 (92.3%) であった。また、*cylA* 検出株のうち cytolysin 産生性を示した株は、国産食肉由来の25株中7株 (28.0%)、輸入食肉由来の10株中6株 (60.0%) であった。この様に、必ずしもPCR産物の増幅による遺伝子の検出とその発現状況は一致しないことが明らかとなった。

11) 次に、*cylA* 遺伝子が検出された35株について、*cyl* オペロンを構成する *cylA*、*cylB*、*cylM*、*cylLs* および *cylLl* 各遺伝子の検出パターンを検討した結果、31株 (88.6%) で *cylA*、*cylB*、*cylM* および *cylLl* の4つの遺伝子が検出されたが、*cylLs* 遺伝子はこれら35株ではいずれも認められなかった。なお、4つの各遺伝子のPCR産物の増幅が認められた31株のうち、表現型としての cytolysin 産生株は12株 (32.3%) であった。

12) 国産および輸入食肉由来 *E. faecalis* の *cylA* と *esp* の両遺伝子のPCR産物のPCR増幅による検出率は低い、これらは他の病原遺伝子のPCR産物の増幅が認められた。また、食肉由来の遺伝子検出の際に、*cylA* や *esp* のどちらか一つの遺伝子がPCRによって検出される事例が存在したが、文献的には易感染者由来株においても同様の事例が報告されている。

以上の結果から、VanA型VREが輸入鶏肉から分離され、日本国内において汚染鶏肉が流通していることが確認された。さらに、その汚染国は発展途上国の一部の地域に限られていることが明らかになった。また、分離菌株についてPFGE法、RAPD法およびPCR-RFLP法による分子疫学的解析を行った結果、VanA型VRE 3株はそれぞれ異なるジェノタイプであり、起源を異にすることが明らかとなった。一方、国産鶏肉からはVanA型VREは検出されなかった。次に、食肉中に分布する腸球菌の病原遺伝子の状況をPCR産物の有無によって検討した結果、国産および輸入鶏肉由来の *E. faecalis* は、いずれかの病原遺伝子の増幅が高率に認められることが確認された。さらに、食肉およびヒト臨床由来株に共通して *cylA* または *esp* 遺伝子を増幅する菌株が認められた。これらの結果は、食肉を汚染しているVREや腸球菌が、ヒトへの感染源の一つとして関与する可能性を示すものであり、食品衛生上重要な知見であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

腸球菌はヒトおよび動物の腸管内に常在する通性嫌気性のグラム陽性球菌である。本菌は冷凍や加熱に対して大腸菌群のように容易に損傷、死滅しないため、食品衛生分野において従来から汚染指標菌として位置づけられている。一方、臨床分野では $\beta$ -ラクタム系薬剤やサルファ剤などに自然耐性を示すが病原性は低いと考えられていた。しかし、1980年代後半からバンコマイシン（VCM）に対する耐性を獲得したVCM耐性腸球菌（VRE：vancomycin-resistant enterococci）の出現がヨーロッパで報告され、薬剤耐性菌として注目されるようになった。さらに、VRE以外の腸球菌も特に免疫力の低下した易感染者に被害を及ぼす可能性が憂慮されている。腸球菌の中でも *Enterococcus faecalis* や *Enterococcus faecium* は、ヒトの疾病との関わりが考えられる病原因子を保有する株もあることが報告され注目されている。そこで、筆者は本菌のヒトへの感染源に関する基礎的研究の一環として、特に国産および輸入鶏肉におけるVREの汚染状況の検討を行い疫学的解析を行うと共に、国産および輸入食肉（鶏肉）における腸球菌の汚染状況と病原遺伝子検出状況について検討した。その概要は以下の通りである。

- 1) 東京都内で購入した国産鶏肉56件および輸入鶏肉32件（ブラジル産11件、中国産8件、米国产8件、タイ産5件）の計88件を対象にVREの汚染実態を調査した結果、19件（21.6%）から本菌が分離された。その内訳は、VanA型VREが3件、VanC型VREが16件であった。VanA型VREが分離された鶏肉はいずれも輸入鶏肉で、ブラジル産1件（9.1%）とタイ産2件（40.0%）であった。VanC型VREが分離された鶏肉は、輸入が5件 [中国産1件（12.5%）およびブラジル産4件（36.4%)]、国産鶏肉が11件（19.6%）であった。
- 2) 分離されたVRE19株について薬剤耐性を支配する遺伝子の型別を行ったところ、VanA型のブラジル産由来の1株は *E. faecium*、タイ産由来の2株は *E. faecalis*、VanC型の16株は全て *E. gallinarum* であった。
- 3) VRE19株についてVCMとテイコプラニン（TEIC）の薬剤感受性試験を行った結果、VanA型のVRE3菌株はVCMに対して256mg/ml以上の高度耐性を示したが、TEICに対しては6mg/ml以下の感受性を示した。VanC型のVRE16菌株は、VCMに対して4mg/ml以下の低度耐性を示したが、TEICに対しては0.94mg/ml以下の感受性を示すことを明らかにした。
- 4) これらの菌株について、pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）法、random amplified polymorphic DNA（RAPD）法、PCR-restriction fragment length polymorphism（PCR-RFLP）法を用いて分子疫学的解析を行った結果、*ApaI* および *SmaI* の制限酵素を用いたPFGE法による解析では、VanA型VREであるタイ産鶏肉由来の2株は類似したパターンを示したが、ブラジル産鶏肉由来株とは異なるジェノタイプの株であることを明らかにした。さらにVanC型VREでは、国産および輸入鶏肉由来株は全て異なったパターンを示した。
- 5) プライマーAP40、AP41、OPA2、OPA3、OPA8、OPA9を用いたRAPD法による分子疫学的解析に

において、VanA型VREであるタイ産鶏肉由来2株は、AP40プライマーでは11本、AP41プライマーでは10本、OPA8プライマーでは4本、OPA9プライマーでは6本のDNA断片が認められる全く同一のRAPDパターンを示した。一方、ブラジル産鶏肉由来の*E. faecium* 99T7-1株は、AP40プライマーでは5本、AP41プライマーでは6本、OPA8プライマーでは3本、OPA9プライマーでは4本のDNA断片が認められるRAPDパターンを示し、タイ産鶏肉由来の2株とは異なるジェノタイプであることを明らかにした。VanC型VREのうちブラジル産鶏肉由来4株は、AP40プライマーでは3パターン、OPA2プライマーでは2パターンにそれぞれ識別され、中国産鶏肉由来株とは異なるパターンを示した。国産鶏肉由来11株は、AP40プライマーでは5パターン、OPA3プライマーでは10パターンにそれぞれ分類されることを明らかにした。

6) *vanA* および *vanC* 領域を増幅して解析するPCR-RFLP法を用いて解析を行った結果、輸入鶏肉から分離されたVanA型VRE3株は制限酵素 *Bam*HI、*Hinc*II および *Pst*I では各2本、*Msp*I では5本に切断され、同一のRFLPパターンを示した。VanC型VREは、*Hinc*II では2本または3本の2群に、*Msp*I では3本または4本のDNA断片が認められる2群に識別された。*Sal*I では16株の全てが2本に切断され同一のパターンを示した。

7) 東京都内で2005年から2006年に購入した国産食肉153件および輸入食肉36件の合計189件を対象に、腸球菌の汚染状況について調査した結果、*E. faecalis* は国産食肉から113件(73.9%)、輸入食肉26件(72.2%)、*E. faecium* は国産食肉13件(8.5%)、輸入食肉3件(8.3%)から分離され、国産食肉と輸入食肉はいずれも*E. faecalis* に高率に汚染されていることを明らかにした。

8) 食肉から分離された腸球菌についてgelatinase (*gelE*) 遺伝子、aggregation substance (*asa1*) 遺伝子、cytolysin (*cyl*) 遺伝子、enterococcal surface protein (*esp*) 遺伝子の状況をPCR産物の有無により検討を行い、国産食肉由来の*E. faecalis* および*E. faecium* では、それぞれ97件(63.4%)と1件(0.7%)で、輸入食肉由来*E. faecalis* では26件(72.2%)で、4つの遺伝子のうちいずれか1つの遺伝子の増幅されていることを明らかにした。

9) *E. faecalis* に認められたPCR産物の増幅により検出された病原遺伝子のうち、国産食肉由来192株では*gelE*のみが検出された株が68株、*gelE* および *asa1* の両遺伝子が検出された株が59株、*gelE*、*asa1* および *cylA* の3つの遺伝子が検出された株が17株であった。一方、輸入食肉由来50株では、*gelE* および *asa1* の両遺伝子が検出された株が19株、*gelE*のみが検出された株が12株であった。

10) *gelE* または *cylA* 遺伝子の検出された株を用いて、PCR産物の増幅による遺伝子の検出とその遺伝子の発現状況について検討した結果、*gelE* 検出株のうちゼラチナーゼ産生性を示したものは、国産食肉では148株中140株(94.6%)、輸入食肉では39株中36株(92.3%)であった。また、*cylA* 検出株のうちcytolysin産生性を示した株は、国産食肉由来の25株中7株(28.0%)、輸入食肉由来の10株中6株(60.0%)であった。この様に、必ずしもPCR産物の増幅による遺伝子の検出とその発現状況は一致しないことを明らかにした。

11) *cylA* 遺伝子が検出された35株について、*cyl* オペロンを構成する *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylLs* および *cylLr*

各遺伝子の検出パターンを検討した結果、31株（88.6%）で *cylA*, *cylB*, *cylM* および *cylL<sub>L</sub>* の4つの遺伝子が検出されたが、*cylL<sub>S</sub>* 遺伝子はこれら35株ではいずれも認められなかった。なお、4つの各遺伝子のPCR産物の増幅が認められた31株のうち、表現型としての cytolysin 産生株は12株（32.3%）であった。

12) 国産および輸入食肉由来 *E. faecalis* の *cylA* と *esp* の両遺伝子のPCR産物のPCR増幅による検出率は低いが、これらは他の病原遺伝子のPCR産物の増幅が認められた。また、食肉由来の遺伝子検出の際に、*cylA* や *esp* のどちらか一つの遺伝子がPCRによって検出される事例が存在したが、文献的には易感染者由来株においても同様の事例が報告されている。

以上の結果から、日本国内において輸入鶏肉から VanA 型 VRE を分離し、その汚染国は発展途上国の一部の地域に限られていることを明らかにした。また、分離菌株について分子疫学的解析を行った結果、VanA 型 VRE 3株はそれぞれ異なるジェノタイプであり、起源を異にすることを明らかにした。また、国産および輸入鶏肉由来の *E. faecalis* は、いずれかの病原遺伝子の増幅が高率に認められることを明らかにした。さらに、食肉由来株の中にヒト臨床由来株と共通した *cylA* または *esp* 遺伝子の増幅する菌株が認められた。これらの結果は、ヒトへの感染源の一つとして食肉を汚染している VRE や腸球菌が関与する可能性を示すものであり、食品衛生上重要な知見であると考えられた。

以上のように、本研究はヒトの VRE 感染症の感染源に関する疫学的研究として、細菌学上、公衆衛生学上および食品衛生学上その進展に寄与するところ大であることから、博士（学術）の学位を授与するに値するものと審査員一同認めた。